

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005577

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-091704
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 1 7 0 4

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

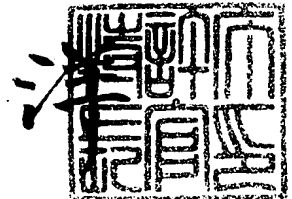
J P 2 0 0 4 - 0 9 1 7 0 4

出 願 人
Applicant(s): テルモ株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 TE0400082
【提出日】 平成16年 3月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 9/133
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
 【氏名】 磯崎 正史
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
 【氏名】 吉野 敬亮
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
 【氏名】 出口 京子
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
 【氏名】 近藤 真代
【特許出願人】
 【識別番号】 000109543
 【氏名又は名称】 テルモ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100080159
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 渡辺 望稔
 【電話番号】 3864-4498
【選任した代理人】
 【識別番号】 100090217
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三和 晴子
 【電話番号】 3864-4498
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006910
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9911809

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

リン脂質を主膜材として含む脂質二重膜で形成されたユニラメラ小胞と、該小胞内に存在する pH が 5 以下の内水相とを備え、かつ薬物を担持させたリボソームであって、前記小胞は、外表面のみが親水性高分子で修飾されたものである、リボソーム製剤。

【請求項 2】

前記薬物が、pH 5 より大きい pH 領域で不安定な薬物である請求項 1 に記載のリボソーム製剤。

【請求項 3】

前記薬物を、少なくとも 0.05 mol 薬物/mol 脂質の濃度で担持する請求項 1 または 2 に記載のリボソーム製剤。

【請求項 4】

前記薬物を、少なくとも 0.1 mol 薬物/mol 脂質の濃度で担持する請求項 1 または 2 に記載のリボソーム製剤。

【請求項 5】

前記主膜材が、相転移点 50℃以上のリン脂質である請求項 1～4 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 6】

前記リン脂質が、水素添加されたリン脂質である請求項 1～5 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 7】

前記リン脂質が、スフィンゴリン脂質である請求項 1～5 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 8】

前記脂質二重膜の膜成分として、前記リン脂質以外の他の脂質類をさらに含む請求項 1～7 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 9】

前記脂質二重膜の膜成分として、コレステロールをさらに含む請求項 6 または 7 に記載のリボソーム製剤。

【請求項 10】

前記親水性高分子が、分子量 500～10,000 ダルトンのポリエチレングリコールである請求項 1～9 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 11】

前記親水性高分子は、親水性高分子のリン脂質またはコレステロール誘導体として導入される請求項 1～10 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 12】

前記リボソーム製剤の平均粒子径が、70～140 nm である請求項 1～11 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 13】

前記リボソーム製剤の平均粒子径が、80～130 nm である請求項 1～11 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 14】

前記リボソーム製剤の平均粒子径が、90～120 nm である請求項 1～11 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 15】

前記内相水の pH が 2～5 である請求項 1～14 のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【請求項 16】

内水相の pH が 5 以下となるように、リン脂質を含む脂質二重膜のユニラメラ層構造の小胞を調製した後、親水性高分子脂質誘導体を添加して前記小胞の外表面のみを修飾し、イオン勾配法を用いて薬物を封入して薬物を担持させた請求項 1 に記載のリボソーム製剤

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リボソーム製剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、ドラッグデリバリーシステムに有用なリボソーム製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、薬物を安全にかつ効率よく目的病巣部位に送達・分布させるドラッグデリバリーシステム（DDS）が盛んに研究されている。その方法のひとつとして、リボソーム、エマルジョン、リピッドマイクロスフェア、ナノパーティクルなどの閉鎖小胞を薬物の運搬体（担体）として利用することが検討されている。しかしながら閉鎖小胞を用いるDDSの実用化に際しては克服すべき様々な課題があり、中でも、生体側の異物認識機構からの回避および体内動態の制御は重要である。つまり、閉鎖小胞を標的部位に高い選択性で送達させるためには、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織（RES）での捕捉を回避し、血液中のオプソニン蛋白質や血しょう蛋白質などとの相互作用（吸着）による凝集を防止して血中安定性を高める必要がある。

【0003】

この課題を解決する方法として、親水性高分子による膜修飾が知られている。親水性高分子で修飾された閉鎖小胞、特にリボソームは、高い血中滞留性が得られることにより、腫瘍組織や炎症部位などの血管透過性が亢進した組織への受動的な集積が可能となり、実用化が進められている（特許文献1～3および非特許文献3～5など参照）。親水性高分子で膜修飾するための修飾剤としては、一般的に、ポリエチレングリコール（PEG）に、リン脂質またはコレステロールなどの脂質を結合したPEG誘導体が好適に用いられる。商業的に入手可能な汎用の修飾剤は、ジアシルフォスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質を結合したPEG誘導体（PEG-PE）である。

【0004】

上記のような修飾が施されるリボソームは脂質二重膜にて形成される閉鎖された小胞であり、その小胞空間内に水相（内水相）を含む。リボソームは、脂質二重膜層の1枚膜からなるユニラメラ小胞（Small Unilamellar Vesicle, SUV、Large Unilamellar Vesicle, LUV）および複数枚からなる多重ラメラ小胞（Multilamellar Vesicle, MLV）などの膜構造が知られている。リボソームに内包された薬物の漏出を抑制するために、リボソームの膜構造をMLV膜とする提案もある（特許文献4参照）。

【0005】

また、上記のようなリボソーム内への薬物封入方法は種々あるが、pH勾配法などのイオン勾配法（特許文献5～7、非特許文献6など参照）を利用すれば、薬物を高濃度に封入できることが知られている。

【特許文献1】 特表平5-505173号公報

【特許文献2】 特公平7-20857号公報

【特許文献3】 特許第2667051号公報

【特許文献4】 国際公開01/000173号パンフレット

【特許文献5】 米国特許第5077056号明細書

【特許文献6】 特許第2847065号公報

【特許文献7】 特許第2659136号公報

【非特許文献1】 Cancer Lett., 1997, 118(2), p.153

【非特許文献2】 Br. J. Cancer., 1997, 76(1), p.83

【非特許文献3】 D. D. Lasic著「LIPOSOMES from Physics to Applications」, Elsevier, 1993

【非特許文献4】 Martin C. Woodle, Gerrit Storm編「Long Circulating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics」, Springer, 1997

【非特許文献5】 D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos編「Medical Applications of LIP

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のようなリボソームに担持させる薬物のうちには、中性条件より高いpH領域では安定性が悪い薬物があり、この場合には、薬物が脂質二重膜中に取り込まれているにせよ、内水相に取り込まれているにせよ、リボソームの内水相を酸性に保つ必要がある。またpH勾配を利用して弱塩基性の薬物をリボソームに封入（担持）する場合には、クエン酸緩衝液を用いて内水相のpHを4前後の酸性条件とし、リボソームの主膜材の相転移点以上の温度（例えば60℃程度）まで加温する。しかしながら、このようにリボソーム内が酸性条件であり、場合によっては高温に晒されることにより、製造時および保存期間中に、膜の劣化により安定性が低下することが懸念される。この点に着目し、酸性で保持する必要のある薬物を、特に親水性高分子で膜修飾したリボソームに担持させたリボソーム製剤の保存性について検討したところ、いくつかの親水性高分子修飾リボソームでは、未修飾のリボソームよりも製造時あるいは保存期間中に担持している薬剤の分解が起こりやすい場合があり、その結果、リボソーム製剤としての保存安定性を損ないやすいという知見を得た。本発明は、このような知見に基づいて、酸性で保持する必要のある薬物あるいは薬物を封入するための手段に起因して結果的に酸性条件下に保持されたかたちとなった薬物を、特に親水性高分子で膜修飾したリボソームに担持させる場合において、親水性高分子本来の膜修飾効果を保持したまま、膜安定性に優れ、保存安定性に優れたリボソーム製剤を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決すべく検討した結果、保持安定性が損なわれやすいリボソーム製剤は、親水性高分子が膜の内外表面ともに修飾されたものであることが判明し、以下のような本発明に係る特定構造のリボソーム製剤およびその製造方法を完成させた。

（1）リン脂質を主膜材として含む脂質二重膜で形成されたユニラメラ小胞と、該小胞内に存在するpHが5以下の内水相とを備え、かつ薬物を担持させたリボソームであって、前記小胞は、外表面のみが親水性高分子で修飾されたものである、リボソーム製剤。

【0008】

（2）前記薬物が、pH5より大きいpH領域で不安定な薬物である前記（1）のリボソーム製剤。

（3）前記薬物を、少なくとも0.05mol薬物/mol脂質の濃度で担持する前記（1）または（2）のリボソーム製剤。

（4）前記薬物を、少なくとも0.1mol薬物/mol脂質の濃度で担持する前記（1）または（2）のリボソーム製剤。

【0009】

（5）前記主膜材が、相転移点50℃以上のリン脂質である前記（1）～（4）のいずれかのリボソーム製剤。

（6）前記リン脂質が、水素添加されたリン脂質である前記（1）～（5）のいずれかのリボソーム製剤。

（7）前記リン脂質が、スフィンゴリン脂質である前記（1）～（5）のいずれかのリボソーム製剤。

（8）前記脂質二重膜の膜成分として、前記リン脂質以外の他の脂質類をさらに含む前記（1）～（7）のいずれかのリボソーム製剤。

（9）前記脂質二重膜の膜成分として、コレステロールをさらに含む前記（6）または（7）のリボソーム製剤。

【0010】

(10) 前記親水性高分子が、分子量500～10,000ダルトンのポリエチレングリコールである前記(1)～(9)のいずれかのリボソーム製剤。

(11) 前記親水性高分子は、親水性高分子のリン脂質またはコレステロール誘導体で導入される前記(1)～(10)のいずれかに記載のリボソーム製剤。

【0011】

(12) 前記リボソーム製剤の平均粒子径が、70～140nm程度である前記(1)～(11)のいずれかのリボソーム製剤。

(13) 前記リボソーム製剤の平均粒子径が、80～130nmである前記(1)～(11)のいずれかのリボソーム製剤。

(14) 前記リボソーム製剤の平均粒子径が、90～120nmである前記(1)～(11)のいずれかのリボソーム製剤。

【0012】

(15) 内相水のpHが2～5である前記(1)～(14)のいずれかのリボソーム製剤

【0013】

(16) 上記のようなリボソーム製剤の好ましい製造方法として、内水相のpHが5以下となるように、リン脂質を含む脂質二重膜のユニラメラ層構造の小胞を調製した後、親水性高分子脂質誘導体を添加して前記小胞の外表面のみを修飾し、イオン勾配法を用いて薬物を封入して薬物を担持させた請求項1に記載のリボソーム製剤の製造方法。

【発明の効果】

【0014】

上記のような特定構造のリボソームであれば、膜内外双方ともに親水性高分子を付加して膜修飾する場合に比べ、全体では相対的に低い修飾率で親水性高分子の効果を発現することができる。すなわち無用な修飾を含まないため、リボソーム膜の安定性に優れ、担持された薬物は保護される。特に、本発明に係るリボソーム製剤は、上述した制約により酸性で保持されている薬物を、製造時および保存時の分解を抑制して、高濃度に安定して担持することができ、かつ親水性高分子本来の高い血中滞留性などの膜修飾効果を保持したまま、保存安定性に優れたリボソーム製剤とすることができる。このような特徴から、本発明のリボソーム製剤は、疾患の治療および／または診断に効果を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明をより詳細に説明する。

リボソームは、リン脂質二重膜からなる閉鎖小胞であり、その小胞空間内に水相（内水相）を含む。リボソーム製剤は、このリボソームを担体とし、これに薬物を担持させたものである。リボソームは、前述したように脂質二重膜の1枚層からなるユニラメラ（一枚膜）小胞（SUV、LUV）および複数枚からなる多重ラメラ小胞（MLV）などが知られているが、本発明に係るリボソームは一枚膜であり、そのうちでも特に、LUV（large unilamellar vesicle）リボソームである。なお本発明では、リボソーム製剤を構成する全小胞中、ユニラメラ小胞が占める割合は、存在比で全体の50%以上であればよく、80%以上であることが好ましい。

また、本発明において薬物を担持させるリボソームは、pH5以下の内水相を含み、かつユニラメラ脂質二重膜は、後述するように、その外膜表面のみが選択的に、親水性高分子で表面修飾された特定の膜修飾構造を有する。

【0016】

上記脂質二重膜は、その主膜材として、少なくともリン脂質（以下、リン脂質類と称することもある）を含む。リン脂質としては、フォスファチジルコリン（＝レシチン）、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジン酸、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、さらにスフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質や、カルジオリピン等の天然あるいは合成のリン脂質もしくはこれらの誘導体、およびこれらを常法にしたがって水素添加したもの等を挙げることがで

きる。

これらのうちでも、水素添加大豆フォスファチジルコリン (HSPC) などの水素添加されたリン脂質、スフィンゴミエリン (Sphingomyelin, SM) 等が好ましい。

【0017】

本発明の特定形態のリボソームを安定的に形成できるものであれば、上記主膜材とともに他の膜成分を含んでいてもよい。たとえば、リン脂質以外の脂質もしくはその誘導体（以下、他の脂質類と称することもある）を含み、上記リン脂質とともに混合脂質による膜を形成することが好ましい。

他の脂質類としては、リン酸を含まない脂質が挙げられ、特に限定されないがグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質および安定化剤として後述するコレステロールなどのステロール等およびこれらの水素添加物などの誘導体を挙げることができる。

【0018】

リボソームは、封入された薬物が、保存時にあるいは血液などの生体中で容易に漏出しないようにするため、相転移点が生体内温度（35～37℃）より高い主膜材を用いることが好適である。さらに、このようなリボソームを製造する場合には、生体温度より高い温度に晒される場合がある。すなわち、50℃～70℃程度、例えば60℃前後の温度条件下で製造されることがあり、熱によるリボソーム形成に対する影響が大きくなるので、これらの温度より高い相転移点を持つ主膜材を用いることが特に好ましい。具体的には、主膜材の相転移点は50℃以上であることが好ましい。

【0019】

本発明において、上記のような脂質二重膜の外膜側は、親水性高分子で選択的に修飾されている。親水性高分子としては、特に限定されないがポリエチレングリコール、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリアスパルトアミド、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。

【0020】

これらの中でも、ポリエチレングリコール (PEG) は、血中滞留性を向上させる効果があり、好ましい。

なお「血中滞留性」とは、薬剤担体を投与した宿主において、担体に担持された状態の薬剤が血液中に存在する性質を意味する。

PEGの分子量は、特に限定されないが、通常、500～10,000ダルトン、好ましくは1,000～7,000ダルトン、より好ましくは2,000～5,000ダルトンである。

【0021】

本発明において、リボソームは、親水性高分子がリボソーム外表面にのみ分布する条件下で形成され、脂質二重膜の外膜が上記親水性高分子で選択的に修飾されている。このようなリボソームでは、その外膜表面の親水性高分子鎖はリボソーム外方に向かって分布しており、一方、脂質二重膜の内水相側内膜は表面修飾されていないため、内水相内には実質的に親水性高分子鎖が分布しない。このような分布構造であれば、内水相が酸性条件であっても、二重膜の内外膜の両側上に親水性高分子が分布するものに比して、膜の安定性を確保することができる。また二重膜の内外膜の両側上に分布するものに比して、全体量として少ない親水性高分子で血中安定性の効果を得ることができる。

【0022】

このようなリボソームは、後述するように脂質二重膜のユニラメラ小胞の未修飾リボソームを形成した後、外部より親水性高分子で膜表面を修飾すれば、脂質二重膜の外膜のみを選択的に表面修飾することができる。この際、親水性高分子の導入ための修飾剤として

、親水性高分子脂質誘導体を用いると、親水性高分子部分が外方に向かって突出した状態で、疎水性部分である脂質部分がリボソームの脂質二重膜中に入り込み安定して保持されるので、リボソームの脂質二重膜の外膜表面上に、脂質に結合した親水性高分子を存在させ、分布させることができる。

【0023】

このような親水性高分子脂質誘導体の脂質（疎水性部分）としては、特に限定されないが、リン脂質、長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキル、またはグリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。たとえば、親水性高分子がポリエチレングリコール（PEG）である場合、その脂質誘導体として、PEGのリン脂質誘導体またはコレステロール誘導体が挙げられる。脂質部分がリン脂質であるときは、該部分がフォスファチジルエタノールアミンであることが望ましい。また、脂質部分がリン脂質であるときは、リン脂質のアシル鎖は、飽和脂肪酸であることが望ましく、またアシル鎖の鎖長はC₁₄—C₂₀、さらにはC₁₆—C₁₈であることが望ましい。具体的には、ジパルミトイル、ジステアロイルあるいはパルミトイルステアロイルである。

これらのうちでも、PEGのリン脂質誘導体であるポリエチレングリコール—ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン（PEG-DSPЕ）は汎用の化合物であり、入手容易である。

【0024】

上記親水性高分子脂質誘導体による膜脂質（総脂質）の修飾率は、膜脂質に対する比率で、通常0.1～20mol%、好ましくは0.1～5mol%、より好ましくは0.5～5mol%とすることができる。

ここでの総脂質とは、親水性高分子脂質誘導体以外の膜を構成するすべての脂質の総量であり、具体的に、リン脂質類および他の脂質類、さらに他の表面修飾剤を含む場合にはこの表面修飾剤も含む。

【0025】

本発明に係るリボソームは、上記脂質および親水性高分子とともに、上記膜構造を保持しうるものであって、リボソームに含むことができる他の膜成分を、本発明の目的を損なわない範囲で含むことができる。

他の膜成分としては、脂質の物性を変化させ担体の膜成分に所望の特性を付与するための、前記親水性高分子以外の表面修飾剤が挙げられる。他の表面修飾剤としては、特に限定されないが、脂質に、前記親水性高分子以外の化合物が結合したものが挙げられる。

【0026】

親水性高分子以外の化合物としては、特に限定されないが、たとえばグルクロン酸、シアル酸、デキストラン、プルラン、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどの水溶性多糖類；酸性官能基を有する化合物；アミノ基、アミジノ基、グアニジノ基などの塩基性官能基を有する塩基性化合物などが挙げられる。塩基性化合物としては、特開昭61—161246号に開示されたDOTMA、特表平5—508626号に開示されたDOTAP、特開平2—292246号に開示されたトランスフェクタム（Transfectam）、特開平4—108391号に開示されたTMAG、国際公開第97/42166号に開示された3,5-ジペンタデシロキシペンズアミジン塩酸塩、DOSPA、TixTM-50、DDAB、DC-CHOL、DMRIEなどの化合物が挙げられる。

【0027】

上記他の表面修飾剤が、脂質に、塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合には、カチオン化脂質と称される。カチオン化脂質の脂質部分はリボソームの脂質二重膜中に安定化され、塩基性官能基部分は担体の脂質二重層の膜表面上（外膜表面上および／または内膜表面上）に存在することができる。カチオン化脂質で膜を修飾することにより、リボソーム膜と細胞との接着性等を高めることができる。

【0028】

本発明において、上記リボソームの内水相は、pH5以下であり、好ましくはpH2～

pH5であり、より好ましくはpH3～pH5であり、特に好ましくは約pH4である。これにより、pH5を超えると不安定な薬物を安定に担持することができる。内水相のpHは、リボソーム調製時に、生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液で調整することができる。

【0029】

上記のようなリボソームには、種々の薬物を担持させることができる。たとえば治療のための薬物としては、具体的に、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメデイエーターの遊離阻害剤、血管内皮細胞の増殖促進または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リボキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤、AGEs (Advanced glycation endproducts) 阻害剤、ラジカルスカベンジャー、タンパク質、ペプチド、グリコサミノグリカンおよびその誘導体、オリゴ糖および多糖およびそれらの誘導体等が挙げられる。

【0030】

本発明のリボソーム製剤は、pH5より大きいpHでは不安定になるような薬物を特に安定に担持することができる。このような薬物としては、具体的に塩酸ドバミン、メシル酸ガベキサート、ノルエピネフリン、塩酸プロムヘキシン、メトクロプラミド、エピネフリン、ビタミンB1、ビタミンB6、カルボプラチン、塩酸ゲムシタピン、酒石酸ピノレピン、硫酸ピンクリスチン等が挙げられる。

【0031】

また診断のための薬物としては、X線造影剤、超音波診断剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬などの体内診断薬が挙げられる。

この他、本発明のリボソームの膜形態を損なわず、pH5以下の液成分に含有あるいは接触しても影響されない薬物、さらにはpH5以下の内水相に封入するのに適した薬物であれば、治療用の薬物も診断用の薬物も特に限定することなく担持させることができる。

【0032】

薬物はその種類によっても所望担持量が異なるが、一般的には高担持率であることが望ましい。本発明では、内水相pHが5以下であることにより、イオン勾配法を利用して薬物を高濃度に担持することができる。

本発明のリボソーム製剤において、好ましい薬物担持量は、リボソーム膜の総脂質に対する濃度で、少なくとも0.05mol薬物/mol脂質であり、より好ましくは少なくとも0.1mol薬物/mol脂質である。ここでの総脂質とは、親水性高分子脂質誘導体以外の膜を構成するすべての脂質の総量であり、具体的に、リン脂質類および他の脂質類、さらに他の表面修飾剤を含む場合にはこの表面修飾剤も含む。

なお本発明において「担持」とは、本質的に、リボソーム（担体）の閉鎖空間内に薬物が封入された状態をいうが、薬物の一部を、膜内に含む状態で、あるいはリボソームの外表面に付着した状態で含んでいてもよい。

【0033】

本発明のリボソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される安定化剤および/または酸化防止剤をさらに含むものであってもよい。

安定化剤としては、特に限定されないが膜流動性を低下させる物質が挙げられ、グリセロール、シュクロースなどの糖類が挙げられる。また、膜構成成分の他の脂質として上述したコレステロール (Cholesterol) などのステロールはこの安定化剤として作用する。

酸化防止剤としては、特に限定されないがアスコルビン酸、尿酸あるいはトコフェロール同族体、たとえばビタミンEなどが挙げられる。トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが、本発明においてはいずれも使用できる。

【0034】

本発明のリボソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される添加物をさらに含むものであってもよい。このような添加物の例として、水、生理食塩水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、PBS、生体内分解性ポリマー、無血清培地、医薬添加物として許容される界面活性剤、前述した生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液などが挙げられる。

添加物は、上記の中から適宜選択され、あるいはそれらを組合せて使用されるが、これらに限定されるものではない。

【0035】

本発明のリボソーム製剤の大きさは特に限定されないが、球状またはそれに近い形態をとる場合には、粒子外径の直径が、70nm～140nm、好ましくは80nm～130nm、より好ましくは90nm～120nmである。

粒子外径の直径とは、動的光散乱法により測定されるリボソーム製剤全粒子の直径の平均値であり、本発明において具体的には、Zetasizer (Malvern Instruments, 3000HSまたはSZEM 5002)を用いて測定した。

【0036】

リボソーム製剤の製造においては、最終滅菌法として、濾過滅菌法が用いられる。濾過滅菌法においては、リボソームは透過するが、指標菌として用いられる*Brevundimonas diminuta*（サイズ、約0.3×0.8μm）は濾過されないことが要求されるため、*Brevundimonas diminuta*に較べ十分に小さい粒子であることが必要である。粒径が100nm付近であることは、この濾過滅菌工程をより確実にする上でも重要である。

【0037】

本発明では、これら添加物を含む態様のリボソーム製剤を、医薬組成物として供することができる。本発明の医薬組成物は、通常の方法、たとえば0～8℃での冷蔵あるいは1～30℃の室温で保存することができる。

【0038】

次に、本発明の特定構造のリボソームの好ましい製造方法を例示するが、これに限定されるものではない。

たとえばフラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次に、当該フラスコ内に内水溶液を加え、激しく攪拌することにより、リボソーム分散液を得る。リボソームの内水相のpHは、添加する内水相溶液を必要に応じpH調整剤などで所望のpHに調整することにより調整できる。次いで、得られたリボソーム分散液を遠心分離し、上清をデカンテーションし精製することにより、リボソーム分散液として得ることができる。親水性高分子によりリボソーム表面を修飾する手段として、ポリエチレングリコール（PEG）のリン脂質やコレステロールなどとの誘導体が好適に用いられ、上述の手法などを用いて得たリボソーム分散液にポリエチレングリコール誘導体をそのままあるいは水溶液として添加することによりPEG鎖が外表面にのみ分布するリボソームを製造することができる。

【0039】

また上記とは別に、反応活性な官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質を含有するリボソームを常法にて製造した後、リボソーム外液に片末端活性化PEGを添加して官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質と結合させることにより、リボソームを製造することもできる。

【0040】

またリボソームは、上記方法以外にも、上記の各構成成分を混合し、高圧吐出型乳化機により高圧吐出させることにより得ることもできる。この方法は、「ライフサイエンスにおけるリボソーム」(寺田、吉村ら；シュブリンガー・フェアラーク東京(1992))に具体的に記載されており、この記載を引用して本明細書の記載されているものとする。

【0041】

上記において、リボソームを所望のサイズにサイジングするために、いくつかの技術が利用可能である(G. Gregoriadis編「Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques」2nd edition, Vol. I-III, CRC Press)。この記載を引用して本明細書の記載されているものとする。

リボソーム分散液は、エクストルーダーを用いて、フィルターを複数回強制通過させることによりユニラメラ化することができる。通常、フィルターは、所望径より大径の孔径をもつもの、最後に所望径の得られるものの孔径の異なるものを2種以上使用する。孔径の異なるフィルターを用いて、エクストルージョンの回数を多くするほどユニラメラ化率が高くなり、実質的にLUVリボソームとみなすことができる。

【0042】

上記のようなリボソームに薬物を担持するには、薬物を含む水溶液でリボソームを構成する脂質膜を水和させることにより薬物をリボソームに担持させる方法(Passive loading)、あるいはリボソーム膜の内側／外側にイオン勾配を形成することで、薬物はこのイオン勾配に従いリボソーム膜を透過させ担持させる方法(Remote loading)がある(前記サイジング技術を記載した文献および米国特許第5192549号、米国特許第5316771号など参照)。

本発明におけるリボソーム製剤の好適な製造方法は、Remote loadingである。この方法では高い薬物／脂質を達成でき、臨床に有効な高担持率のリボソーム製剤を得ることができる。

【0043】

例えば、pH勾配によるイオン勾配を用いる方法としては、フラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次いで、酸性緩衝液(例えばpH4の緩衝液)を加え振とうしリボソーム分散液を得る。さらに必要に応じリボソーム粒径のサイジングを行い、リボソーム外液をゲルろ過などの方法によりpHが中性付近の外水相に置換する方法や適当なpH調整剤によりリボソーム外水相のpHを中性付近(例えばpH7～7.5付近)に調整する方法等によりpH勾配を形成し、このリボソーム分散液に薬物を含む水溶液を加え、この溶液をある時間加温することにより薬物を担持させることができる。なお、本発明において、親水性高分子の修飾は、前述した通り脂質二重膜のユニラメラ小胞を形成した後であれば、薬物担持操作の前後どちらでも行うことができる。

【0044】

また、アンモニウムイオン勾配を用いる方法としては、上記薄膜形成後、硫酸アンモニウム溶液を用いリボソーム分散液を得る。次いで、透析あるいはゲルろ過法によりリボソームの外水相のアンモニウムイオンをナトリウムまたはカリウムイオンなどに置換することにより、リボソームの内側／外側にアンモニウムイオン勾配を形成し、ここに薬物を含む水溶液を加え、ある時間加温することにより薬物を担持することができる。また、硫酸アンモニウム分散液に適当なpH調整剤を加えることにより、リボソームの内水相のpHを5以下とすることもできる。

【0045】

リボソーム製剤の非経口的投与の経路としては、たとえば点滴などの静脈内注射(静注)、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。リボソーム製剤の具体的な投与方法としては、医薬組成物をシリンジや点滴によって投与することができる。また、カテーテルを患者または宿主の体内、たとえば管腔内、たとえば血管内に挿入して、その先端を標的部位付近に導き、当該カテーテルを通して、所望の標的部位またはその近傍あるいは標的部位への血

流が期待される部位から投与することも可能である。

【0046】

本発明のリボソーム製剤は、病気に既に悩まされる患者に、疾患の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。たとえばリボソーム製剤に封入される薬物の有効投与量は、通常、一日につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。しかしながら、本発明のリボソーム製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。投与時期は、疾患が生じてから投与してもよいし、あるいは疾患の発症が予測される時に発症時の症状緩和のために予防的に投与してもよい。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

【実施例】

【0047】

次に実施例、試験例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例、試験例に限定されるべきものではない。

なお、各例で用いた成分の分子量は次のとおりである。

水素添加大豆レシチン（以下、HSPCと称することがある、分子量790、リポイド(Lipoid)社製SPC3）

コレステロール（以下、Cholと称することがある、分子量386.65、ソルベイ(Solvay)社製）

塩酸ドキソルピシン（分子量579.99）

スフィンゴミエリン（以下、SMと称することがある、分子量703.3、アバンチポーラーリピッズ(Avanti Polar Lipidos)社製）

ポリエチレングリコール5000-フォスファチジルエタノールアミン（以下、PEG5000-DSPEと称することがある、分子量6075、日本油脂社製）

3,5-ジベンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（分子量609.41）

【0048】

（実施例1）ドキソルピシン内封リボソームの製造例

この実施例1では、本発明のリボソーム製剤例を示す。以下に示すように、低pH条件下（pH4）で製造したリボソームに、親水性高分子脂質誘導体（PEG5000-DSPE：分子量5000ダルトンのポリエチレングリコールのジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン誘導体）を添加することにより、リボソームの外膜表面に親水性高分子（PEG鎖）を分布させ、さらにイオン勾配法により薬物を導入することでLUVリボソームを製造した。

水素添加大豆フォスファチジルコリン（HSPC）：コレステロール（Chol）=54：46のモル比でt-ブタノールに溶解し、凍結乾燥させて膜成分の混合脂質を調製した。

300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸三ナトリウム溶液とを混合し、pH4.0に調整した内水相溶液と、pH7.5に調整した外水相溶液とを調製した。

【0049】

上記で調製した混合脂質を0.37g秤量した後に、内水相溶液10mLを加え、68℃の恒温槽にて15分間膨潤したのち、ボルテックにて攪拌し、リボソーム粗分散液を調製した。68℃に加温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes 社製)を用いて孔径200nmのフィルターを5回通し、孔径100nmのフィルターに交換後、さらに2回同様の操作を行い（φ200nm×5、φ100nm×5、φ100nm×5）、LUVリボソーム分散液を調製した。エクストルージョン後のサンプルは水冷した。

【0050】

上記で調製したリボソーム分散液を、外水相で十分に置換したゲルカラム（Sephacrose 4 Fast Flow）にてゲルろ過を行い、pH勾配を形成した。ゲルろ過後のサンプルは水冷した。

【0051】

ゲルろ過後のリボソームの脂質定量（HSPC定量）を行い、HSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、PEG5000-DSPE（日本油脂社製）を、1.0mol%にな

るように加え、60℃、30分攪拌し、PEG₅₀₀₀-DSP_Eを導入した。

【0052】

さらにHSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、塩酸ドキソルピシン/HSPC=0.2 (w/w) になるように塩酸ドキソルピシン量を計算し、計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルピシンを秤量し10% Sucrose (pH 9.0) 溶液を用いて10mg/mLの溶液を調製した。リボソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルピシン溶液(10mg/mL)を加え60℃で60分攪拌を行い塩酸ドキソルピシンの導入を行った。塩酸ドキソルピシン導入後のサンプルは水冷した。外水相で十分に置換したカラム(Sepharose 4 Fast Flow, φ2.8cm×20cm)を用いてゲルろ過を行いリボソームに封入されていない塩酸ドキソルピシンを除去した。

【0053】

実施例1において、リボソームリン脂質は、リン脂質Cテストワコー(和光純薬社製)を用いて定量した。

またリボソーム内に封入されたドキソルピシン濃度は、ドキソルピシンリボソーム40μLにメタノール2mLを加えた溶液について、480nmでの吸光度を分光光度計で測定して求めた。

粒子径は、リボソーム分散液20μLを生理食塩水で3mLに希釈し、Zetasizer3000HS (Malvern Instruments.)で測定した平均粒子径である。

得られたリボソームを表1に示す。

【0054】

(比較例1) ドキソルピシン内封リボソームの製造例

この比較例1では、本発明範囲外のリボソーム製剤例を示す。親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSP_E)をリボソーム形成時に共存させることにより、リボソームの二重膜の内外膜の両側上に親水性高分子(PEG鎖)を分布させた以外は、実施例1と同様のリボソーム成分を使用して、リボソーム製剤を製造した。

すなわち、実施例1と同じ混合脂質(HSPC:Chol=54:46)を0.37g秤量し、その後HSPC濃度をもとにPEG₅₀₀₀-DSP_Eを2.0mol%になるようにPEG₅₀₀₀-DSP_Eを0.073g秤量し、エタノール1mLを加え、65℃の恒温槽にて30分間溶解させた。完全溶解確認後、内水相10mLを加え、さらに65℃で60分加温攪拌を行いリボソーム粗分散液を調製した。エクストルーダー用いて、実施例1と同じ操作を行い、エクストルージョン後のサンプルは水冷した。

【0055】

調製したリボソームを、外水相で十分に置換したゲルカラム(Sepharose 4 Fast Flow)にてゲルろ過を行い、実施例1と同様にpH勾配を形成し、ゲルろ過後のサンプルは水冷した。

【0056】

ゲルろ過後のリボソームの脂質定量(HSPC定量)により算出されたHSPC濃度をもとに、塩酸ドキソルピシン/HSPC=0.2 (w/w) になるように塩酸ドキソルピシン量を計算し、計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルピシンを秤量し、10% Sucrose (pH 9.0) 溶液を用いて10mg/mLの溶液を調製した。

リボソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルピシン溶液(10mg/mL)を加え、実施例1と同様に塩酸ドキソルピシンの導入操作を行い、リボソームに封入されていない塩酸ドキソルピシンを除去した。

【0057】

実施例1と同様に、リボソームリン脂質の定量、リボソーム内に封入されたドキソルピシン量、粒子径を測定した。得られたリボソームを表1に示す。

【0058】

(実施例2) ドキソルピシン内封リボソームの製造例

膜成分に、スフィンゴミエリン(Sphingomyelin, SM):Chol=55:45の混合脂質を用いて、本発明のリボソーム製剤を製造した。

SM:Cholesterolを55:45のモル比でクロロホルム／メタノール混液に溶解し、溶媒を減圧留去し薄膜を形成した。300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸三ナトリウム溶液を混合しpH4.0に調整して内水相溶液とした。

混合脂質0.30gを秤量し、内水相溶液5mLを加え、70℃で10分間水和させた。時々、55℃に暖めたバス型ソニケーターで超音波をかけることで、脂質を均一に分散させた。

得られた脂質分散液を65℃に保温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes 社製)を用いて、孔径400nmのフィルターを3回通し、孔径200nmのフィルターに交換後さらに3回通し、孔径100nmのフィルターに交換後さらに2回同様の操作を行った(φ400nm×3、φ200nm×3、φ100nm×5、φ100nm×5)。エクストルージョン後のサンプルは水冷した。

調製したリボソームを生理食塩水にて十分に置換したゲルカラム(Sepharose 4 Fast Flow)にてゲルろ過を行った。ゲルろ過後のサンプルは水冷した。

【0059】

ゲルろ過後のリボソームの脂質定量(HSPC定量)を行い、HSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、PEG₅₀₀₀-DSPEを0.75mol%になるように加え60℃、30分攪拌し、PEG₅₀₀₀-DSPEを導入した。

さらにHSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、リボソームの総脂質量に対して20mol%塩酸ドキソルピシン量を計算し、計算結果をもとに必要な量の塩酸ドキソルピシンを秤量し、生理食塩水を用いて10mg/mLの溶液を調製した。

リボソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルピシン溶液(10mg/mL)を加え1N NaOHまたは飽和炭酸水素ナトリウム水でpH7.4に調整した後、65℃で30分攪拌を行い塩酸ドキソルピシンの導入を行った。塩酸ドキソルピシン導入後のサンプルは水冷した。

生理食塩水で十分に置換したカラム(Sepharose 4 Fast Flow)を用いてゲルろ過を行いリボソームに封入されていない塩酸ドキソルピシンを除去した。

【0060】

実施例1と同様に、リボソームリン脂質の定量、リボソーム内に封入されたドキソルピシン量、粒子径を測定した。得られたリボソームを表1に示す。

【0061】

【表1】

表1

	膜構成 (mol比)	粒子径 nm	薬物担持量 mol薬物/mol脂質
実施例1	HSPC: Chol: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =54:46:1	118.8	0.11
比較例1	HSPC: Chol: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =54:46:2	112.9	0.13
実施例2	SM: Chol: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =54:46:0.75	107.4	0.12

【0062】

(実施例3)

HSPC:Chol:3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩を、50/42/8のモル比で、1-ブタノールに溶解し、凍結乾燥させて混合脂質を得た。

300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸3ナトリウム溶液を混合してpH

4に調整した内水相溶液とした。

混合脂質0.30gを秤量し、pH4に調整した内水相溶液5mlを加え、70℃で10分間水和させた。時々、55℃に暖めたバス型ソニケーターで超音波をかけることで、脂質を均一に分散させた。得られた脂質分散液を73℃に保温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes 社製)を用いて、 $\phi 0.4\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを3回、 $\phi 0.2\mu\text{m}$ を3回、 $\phi 0.1\mu\text{m}$ を10回通すことによってLUVの分散液を得た。得られたリボソームの粒子径は111.3nmであった。

上記で調製したリボソーム分散液を、カラム(Sepharose 4 Fast Flow, $\phi 1.5\text{cm} \times 25\text{cm}$)に添加し、生理食塩水で溶出させてゲル濾過し、外水相を生理食塩水で置換した。

【0063】

PEG₅₀₀₀-DSPEを生理食塩水に10mg/mLになるよう溶解し、これを外水相にリボソームの総脂質量に対して0.75mol%分のPEG₅₀₀₀-DSPEとなるように加えて、攪拌しながら60℃で30分間インキュベートした。

ドキソルピシン(M_w=580)を生理食塩水に10mg/mLになるよう溶解し、この液をリボソームの総脂質量に対して20mol%のドキソルピシンとなるように加え、1N NaOHまたは飽和炭酸水素ナトリウム水でpH7.4に調整した後、65℃で30分インキュベートした。

【0064】

上記において、リボソームリン脂質は、実施例1と同様に定量した。

粒子径はリボソーム分散液100 μl を生理食塩水で3mLに希釈して、Zetasizer S ZEM 5002 (Malvern Instruments.)で測定した。

リボソーム内に封入されたドキソルピシン量(薬物担持量=薬剤/脂質)は、ドキソルピシンリボソーム0.1mLに1N HCl 0.3mLとイソプロパノール3.6mLとを混合した液について、480nmでの吸光度を分光光度計で測定して求めた。

ドキソルピシン量は、0.12mol/molであった。

【0065】

(試験例1)

以下の4種の緩衝液に、PEG₅₀₀₀-DSPE(日本油脂社製)を、5mg/mLとなるよう溶かし、65℃で90分間加熱した。また、PEG₅₀₀₀-DSPEを、同様の緩衝液に10mg/mLとなるよう溶かし、40℃で1週間保存した。

緩衝液(1): 硫酸アンモニウム(25.0mM)

緩衝液(2): L-Histidine(10mM), 10% Sucrose pH6.5

緩衝液(3): クエン酸(300mM) pH4.0

緩衝液(4): クエン酸(300mM) pH7.5

【0066】

保存後の溶液を10 μL とり、20cm \times 20cmのシリカゲル薄層板の下部より1cmのところへスポットした。予めクロロホルム/メタノール/アンモニア水(28)混液(85:14:1)の展開溶媒で平衡化したガラス容器の中へ、シリカゲル薄層板を入れ、展開溶媒にて約15cm展開し、ヨウ素発色法により分解物を検索した。

この薄層クロマトグラフィー(TLC)を図1~2に示す。

図1は、PEG₅₀₀₀-DSPE溶液を65℃、90分間加熱後のTLCの結果であり、図2は、PEG₅₀₀₀-DSPE溶液を40℃、1週間加熱後のTLCの結果である。

その結果、pH5以上の緩衝液に溶かしたものについては、加熱前後で分解物(リゾ体)の位置(Lyso-PEG Stdのスポット参照)にスポットの増大を認めなかったが、pH4の緩衝液中に溶解させた物については明確に分解物(リゾ体)のスポットの増大を認めた。

【0067】

試験例1は、酸性条件下における親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE)の安定性のデータを示す。PEG₅₀₀₀-DSPEは、酸性条件(緩衝液(3)クエン酸pH

4. 0) で加温すると分解が進行することを示している。すなわち、比較例 1 に例示した酸性緩衝液条件下に PEG₅₀₀₀-DSPPE が存在する方法で製造するリボソームでは、製造時および保存時において PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解が予想される。また、比較例 1 の方法で製造したリボソームは、内水相が酸性であり、内水相側に分布する PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解も予想される。その結果を試験例 2 に示す。

【0068】

(試験例 2) 実施例 1 と比較例 1 のリボソームにおける PEG の分解挙動比較

実施例 1 と比較例 1 によって調製したリボソーム 2 種を 40℃ で 1 週間・2 週間保存後、HPLC 法を用いて PEG₅₀₀₀-DSPPE 定量した。

結果を、4℃ 保存の PEG リボソームに対する PEG₅₀₀₀-DSPPE の残存率で図 3 に示す。

試験例 2 の結果は、比較例 1 のリボソームでは、PEG₅₀₀₀-DSPPE の残存率が低下し、PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解が起きていることを示している。一方、実施例 1 の本発明のリボソームでは PEG₅₀₀₀-DSPPE の残存率に変化がなく、PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解が起きてないことを示している。

すなわち PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解を防ぐことにより、PEG₅₀₀₀-DSPPE の分解に伴う脂質二重膜の不安定化、リボソームの担持薬剤の漏出、リボソームの凝集、リボソームの血しょう蛋白やオプソニン蛋白との吸着防止効果の低下、リボソームの血中での安定性を損なう等の課題を克服することができる。

【図面の簡単な説明】

【0069】

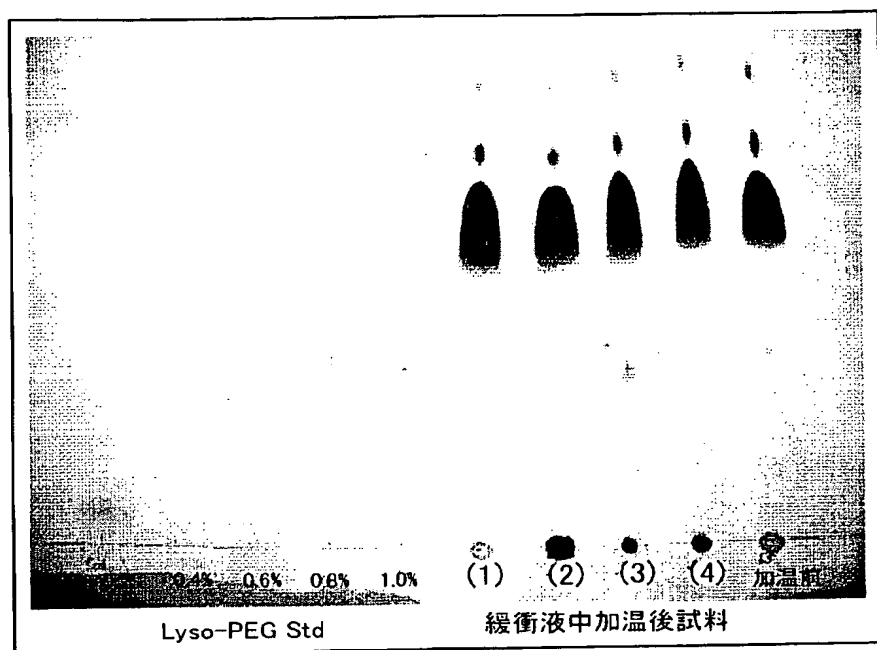
【図 1】 親水性高分子脂質誘導体 (PEG₅₀₀₀-DSPPE) の安定試験後の TLC を示す。

【図 2】 親水性高分子脂質誘導体 (PEG₅₀₀₀-DSPPE) の安定試験後の TLC を示す。

【図 3】 保存試験における PEG₅₀₀₀-DSPPE の残存率を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

